

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-159793

(P 2 0 0 0 - 1 5 9 7 9 3 A)

(43) 公開日 平成12年6月13日(2000.6.13)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C07J 63/00		C07J 63/00	4C086
A61P 1/16		A61K 31/00	601 K 4C091
9/10			609 G
9/00			609
11/00			611
審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全3頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-337645

(22) 出願日 平成10年11月27日(1998.11.27)

(71) 出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(71) 出願人 598149471

中国医学科学院薬用植物研究所

中華人民共和国北京市海淀区西北旺(番地なし)

(72) 発明者 菅原 孝子

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(74) 代理人 100074114

弁理士 北川 富造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換増殖因子 $\beta$ 阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 低分子化合物を有効成分とする新規なTGF- $\beta$ 阻害剤を提供する。

【解決手段】 オレアノール酸又はその塩を有効成分とするTGF- $\beta$ 阻害剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】オレアノール酸又はその塩を有効成分とする形質転換増殖因子 $\beta$ 阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】オレアノール酸を有効成分とする形質転換増殖因子 $\beta$ 阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】形質転換増殖因子 $\beta$ （以下、TGF- $\beta$ とする）は線維芽細胞の増殖を促進する因子として1982年に発見されたものであり、その後の研究から112個のアミノ酸から成る2本のペプチドがジスルフィド結合で連結する分子量25kDaのホモダイマーであることが明らかとなっている。現在は線維芽細胞だけでなく多くの細胞に対し増殖抑制因子として作用することが判明しており、代表的な生理作用としては血球細胞の増殖抑制、免疫系細胞の増殖と機能の抑制、細胞外基質の産生促進、Th2細胞のアポトーシス誘導の抑制等を挙げることができる。

【0003】また、TGF- $\beta$ は慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、肝硬変、肺繊維症、動脈硬化など様々な疾患との関連を示唆する報告（Bio Clinica, 12(6), 40, (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 1814, (1993)、Engl. J. Med, 324, 933, (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci, 88, 6642, (1991)）があり、TGF- $\beta$ を阻害する物質はこれら疾患の有効な治療薬となることが期待されている。

【0004】これまで発見されているTGF- $\beta$ 阻害物質としては、抗TGF- $\beta$ 抗体（Nature, vol. 346, p281 (1990)）やデコリン（Cell, vol. 69, p1067, (1992)）などの高分子蛋白質が挙げられる。

【0005】しかし、医薬品として開発する上では安定性等の問題から低分子化合物が望ましい。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、低分子化合物を有効成分とする新規なTGF- $\beta$ 阻害剤を提供することを目的とする。

【0007】

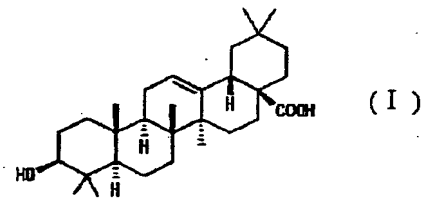
【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的に鑑み鋭意検討を重ねた結果、ある種の五環性トリテルペン化合物がTGF- $\beta$ 阻害作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明はオレアノール酸又はその塩を有効成分とするTGF- $\beta$ 阻害剤である。

【0009】本発明の有効成分であるオレアノール酸は、式(I)

【0010】

## 【化1】



【0011】で表される。

【0012】また、オレアノール酸はオリーブ葉、センブリ、チョウジ等多くの植物に含まれることが知られており、これらの植物より公知の方法で抽出・分離精製することにより得ることができる。また、ニンジン、サトウダイコン等に存在するサポニンを酸加水分解することによっても得られる。さらに、オレアノール酸は市場で一般に入手することも可能であり、例えばシグマケミカルカンパニー等から購入した市販品を本発明に使用してもよい。

【0013】また、本発明においてオレアノール酸塩とは、オレアノール酸の薬学的に許容される塩を意味し、具体的には、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩やカルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルギニン塩などの塩基性アミノ酸塩を含む有機酸塩等を挙げることができる。

【0014】本発明のTGF- $\beta$ 阻害剤は、医薬として使用することが可能であり、TGF- $\beta$ 阻害活性に基づく医薬組成物、具体的には、例えば慢性糸球体腎炎、腎臓間質性線維症、糖尿病性腎症、肝線維症、肝硬変、肺繊維症、ケロイド、強皮症、動脈硬化、後部心筋梗塞、心臓性線維症、血管形成後再狭窄、急性巨核芽球性白血病、成人T細胞白血病などの疾患のTGF- $\beta$ 阻害活性に基づく予防剤又は治療剤も本発明の範囲である。

【0015】本発明のTGF- $\beta$ 阻害剤において、有効成分であるオレアノール酸又はその塩の投与量は、疾患及びその症状によって異なるが、通常成人を治療する場合で0.01~1000mgであり、これを1日2~3回に分けて投与する。

【0016】本発明のTGF- $\beta$ 阻害剤は、公知の方法で適当な賦形剤を用いて錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤等の経口剤として使用することができる。また、軟膏、クリーム等の外用剤として、あるいは注射剤としても使用することができる。

【0017】

【発明の効果】本発明により新規なTGF- $\beta$ 阻害剤の提供が可能となり、慢性糸球体腎炎、腎臓間質性線維症、糖尿病性腎症、肝線維症、肝硬変、肺繊維症、ケロイド、強皮症、動脈硬化、後部心筋梗塞、心臓性線維症、血管形成後再狭窄、急性巨核芽球性白血病、成人T細胞白血病などの疾患治療に有用である。

【0018】以下、試験例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【0019】試験例1  
 <TGF- $\beta_1$  受容体結合試験>実験には Balb/c 3T3 細胞を用い、24穴プレートに1穴あたり2~3 $\times 10^4$ 個の密度で播種して2~3日培養した。培地はダルベッコ改変イーグル培地(低グルコース含有)に牛血清10%、抗生物質(ペニシリンG100units/ml-ストレプトマイシン100 $\mu$ g/ml)を添加して用いた。コンフルエントに達した細胞の培地をバインディングバッファー(\*1)に交換して4℃で30分間インキュベートした。さらにバインディングバッファー(270 $\mu$ l)を交換して検体調製液(15 $\mu$ l)および [ $^{125}$ I] TGF- $\beta_1$  (15 $\mu$ l)を添加し、4℃で4時間インキュベートして結合反応させた。次にバインディングバッファーにて5回洗浄後、細胞溶解液(\*2)を1.0ml加えて、再度4℃で40分間インキュベートした。その後、細胞溶解液の放射活性をガンマカウンターにて測定した。尚、上記実験において検体調製液に変えてバッファーのみの調製液を加えた際の放射活性を総結合法、検体調製液にかえて200倍過剰量の非放射性TGF- $\beta_1$ を含む調製液を添加した際の放射活性を非特異的結合量として求め、総結合量から非特異的結合量を引いた値を特異的結合量とした。検体のTGF- $\beta_1$  受容体拮抗活性はTGF- $\beta_1$  の特異的結合を50%抑制する濃度(IC<sub>50</sub>)として算出した。その結果、TGF- $\beta_1$  の特異的結合を50%抑制するオレアノール酸の濃度は18.2 $\mu$ g/mlであった。

【0020】なお、測定に用いた試薬を以下に示した。

\*1 バインディングバッファー

50mM ヘブス/水酸化ナトリウム(pH7.5)

128mM 塩化ナトリウム

5mM 硫酸マグネシウム

1.2mM 塩化カルシウム

5mM 塩化カリウム

2mg/ml 牛血清アルブミン

\*2 細胞溶解液

1% (v/v) トライトンX-100

10% (v/v) グリセロール

10 25mM ヘブス/水酸化ナトリウム(pH7.5)

1mg/ml 牛血清アルブミン。

【0021】試験例2

<TGF- $\beta_1$  の細胞増殖抑制活性に対する作用>ミンク肺上皮細胞(Mv1 Lu細胞)を24穴プレートに播種してMEM培地(10%FBS)で24時間培養後、枯渇条件下(0.02%FBS)に24時間静置した。続いて濃度10pMTGF- $\beta_1$  と被験化合物(終濃度0.1~5 $\mu$ g/ml)を添加したMEM培地(10%FBS)で24時間培養後、1穴あたり1 $\mu$ Ciの $^3$ H-チミジンを添加して2時間培養し、この間の $^3$ H-チミジンの取り込みを細胞増殖の指標とした。 $^3$ H-チミジンの取り込みは10pMTGF- $\beta_1$  によって90%抑制されるため、TGF- $\beta_1$  阻害活性は被験化合物を加えることによる $^3$ H-チミジン取り込み量の回復率(%)を指標として評価した。その結果、TGF- $\beta_1$  の細胞増殖抑制活性を50%阻害するオレアノール酸の濃度(IC<sub>50</sub>)は0.7 $\mu$ g/mlであった。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターコード (参考)
13/12			613 G
A61K 31/56		31/56	
(72) 発明者 斉藤 秀次	東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内	Fターム(参考)	4C086 AA01 AA02 DA50 MA01 MA04 MA16 MA28 MA35 MA37 MA41 MA52 MA66 NA14 ZA36 ZA45 ZA75 ZA81 ZB21 ZB27
(72) 発明者 吉村 広光	東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内		4C091 AA06 BB20 CC01 DD01 EE04 FF06 GG03 GG05 HH01 JJ03 KK01 LL03 LL06 MM01 NN01 PA02 PA12 QQ05 QQ15
(72) 発明者 宮田 則之	東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内		
(72) 発明者 楊 峻山	北京市海淀区西北旺中国医学科学院药用植物研究所内		